Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. F. Lembeck

Die Gewinnung von Substanz P aus der Proteolipidfraktion von Hirngewebe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Adolf Heizmann
aus Hirrlingen

1965

8186

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. F. Lembeck

Die Gewinnung von Substanz P aus der Proteolipidfraktion von Hirngewebe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Adolf Heizmann
aus Hirrlingen

1965

Dekan : Professor Dr. W.SCHULTE

1.Berichterstatter: Professor Dr. F.LEMBECK
2.Berichterstatter: Professor Dr. J.PEIFFER

Fotodruck PRÄZIS · Tübingen

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Methodik	2 - 9
Ergebnisse	10 - 19
Diskussion	20 - 23
Zusammenfassung	24 - 25
Literaturverzeichnis	26 - 27
Lebenslauf	28

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547608_0002

Die bisherigen Methoden zur Extraktion von Substanz P aus Gewebe sind Variationen des Verfahrens, mit dem v. EULER und GADDUM 1931 die Substanz P entdeckt haben.

Das Gewebe wird bei saurem pH gekocht, inaktives Protein mit Äthanol gefällt. Der getrocknete Überstand kann mit bekannten Verfahren (Fällung mit Ammoniumsulfat, Eisessig-Äther-Fällung, Säulenchromatographie, Gegenstromverteilung; P. PERNOW, 1953; F. LEMBECK, 1953; J. FRANZ, A. BOISSONNAS, E. STÜRMER, 1961; K. VOGLER, W. HAEFELY, A. HÜRLIMANN, R.O. STUDER, W. LERGIER, R. STRÄSSLE, K.H. BERNEIS, 1962; H. ZUBER, R. JAQUES, 1962) weiter konzentriert werden. In der von AMIN et al. (1954) beschriebenen Modifikation wird zuerst mit Aceton 5-Hydroxytryptamin extrahiert und aus dem getrockneten Rückstand durch saures Kochen Substanz P gewonnen.

LEACH fand 1959, dass aus dem Pulver des getrockneten Rückstandes der Acetonextraktion nach Behandlung mit n-Butanol mehr Substanz P gewonnen werden konnte als ohne diese Behandlung. Sie vermutete, dass Substanz P an ein Lipoprotein gebunden sein könnte.

1951 beschrieben FOLCH und LEES das Vorkommen von Proteolipiden als einer Untergruppe der Lipide im Gehirn und in anderen Geweben.

Um die Beziehungen zwischen der Substanz P und der Proteolipidfraktion der Hirnlipide zu untersuchen, haben wir in dieser Arbeit ein Substanz P-Präparat, das mit der GADDUM-Methode aus Schweinehirn hergestellt worden ist, mit einem Präparat verglichen, das wir aus der Proteolipidfraktion von Schweinehirn gewinnen konnten. Ausserdem haben wir Präparate, die mit den beiden Verfahren aus verschiedenen Gebieten des menschlichen Gehirns hergestellt worden sind, am Meerschweinchenileum miteinander verglichen.

Um zu sehen, ob andere biologisch aktive Peptide in ähnlicher Bindung vorliegen, haben wir untersucht, ob Ocytocin aus Hypophysenhinterlappen des Schweines auch in der Proteolipidfraktion auftritt.

M e t h o d i k

1. Material

Das Hirn wurde etwa 10 Minuten nach dem Tod der Tiere entnommen. Das Kleinhirn, die weichen Häute und Blutcoagula wurden entfernt, das Gewebe grob homogenisiert und bei -18° C eingefroren.

Mit beiden Extraktionsverfahren wurden je 5 kg Schweinehirn aufgearbeitet.

Mit dem Hirn wurden auch die Hypophysen der Tiere entnommen. Die Hinterlappen wurden abgetrennt und bei -18° C aufbewahrt.

Aus menschlichen Gehirnen wurden 16 bis 40 Stunden nach dem Tod ohne genauere Lokalisation Teile des Cortex, der Basalganglien und des Kleinhirns entnommen. Ferner wurde Substantia nigra aufgrund ihrer Färbung exakt dem Gewebe entnommen. Das Gewebe der einzelnen Regionen wurde, nachdem es homogenisiert worden ist, halbiert. Die eine Hälfte wurde mit dem Verfahren nach GADDUM extrahiert, die andere Hälfte mit dem Chloroform-Methanol-Verfahren. Wir untersuchten auf diese Weise die oben genannten Regionen von 3 Gehirnen.

Als Standard verwendeten wir ein Substanz P-Präparat der Firma Sanabo, das nach dem Verfahren von PERNOW (1953) aus Rinderdarm hergestellt worden ist. Die Aktivität dieses Präparates betrug 13.2 Ė/mg.

Bei der Testung der Extrakte aus Hypophysenhinterlappen benutzten wir als Standard Syntocinon(R) (Sandoz) (10 I.E./ml).

2. Extraktion von Substanz P

Verfahren nach GADDUM: Portionen von je 200 g des gefrorenen, grob homogenisierten Gewebes wurden mit der vierfachen Menge n/10 HCl homogenisiert und 10 Minuten gekocht. Mit n NaOH wurde das pH auf 5.5 eingestellt. Der nach der Zentrifugation erhaltene, klare Überstand wurde im Rundlaufverdampfer eingeengt, das pH mit NaOH auf 8.0 gebracht und das vierfache Volumen absoluten Alkohols zugesetzt. Die Fällung wurde abzentrifugiert, das Präcipitat in Wasser aufgenommen und die Behandlung mit Alkohol wiederholt. Die alkoholischen Überstände wurden vereinigt und das pH mit n HCl auf 4.0 gebracht. Der Gesamtüberstand wurde in vacuo gefriergetrocknet und das trockene Pulver (Laborbezeichnung "GE_1") in Wasser (100 ml/kg Gewebe) gelöst. Bei der anschliessenden Ammoniumsulfatfällung wurden 53.2 g Ammoniumsulfat je 100 ml Lösung zugefügt und die Lösung über Nacht bei +4° C aufbewahrt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und getrocknet (GADDUM, 1964).

Für die Eisessig-Äther-Fällung wurden alle diese Niederschläge vereinigt und zweimal mit Eisessig (0.1 ml/g Gewebe) extrahiert. Aus den vereinigten Eisessig-Überständen wurde durch Fällen mit dem sechsfachen Volumen Äther der Substanz P-haltige Niederschlag (Laborbezeichnung "GE_2") gewonnen (LEMBECK, 1953).

Auf gleiche Weise wurde das Gewebe aus menschlichem Gehirn extrahiert.

Extraktion mit Chloroform-Methanol: Aus dem Vorrat des gefrorenen, grob homogenisierten Gewebes wurden Portionen von

200 g Gewebe mit der zehnfachen Menge Chloroform-Methanol 2 : 1 (v/v) homogenisiert. Das Homogenat wurde filtriert. Das Filtrat, welches die Lipide und Begleitsubstanzen von Nichtlipid-Charakter enthält, wurde dann mit dem 0.2fachen Volumen Wasser gewaschen, um die Nichtlipide, die sich nach dem Zentrifugieren in der oberen, wässrigen Phase befinden, abzutrennen (FOLCH et al., 1957). Die obere Phase wurde abpipettiert, die untere im warmen Luftstrom getrocknet (Laborbezeichnung "CM_1"). Der trockene Rückstand wurde mit der zehnfachen Menge n/10 HCl homogenisiert und 10 Minuten gekocht. Das gekochte Homogenat wurde zentrifugiert, der opalescente Überstand abgegossen und mit n NaOH auf pH 5.5 gebracht. Es bildete sich ein feinflockiger Niederschlag, der beim Zentrifugieren sedimentierte. Der klare Überstand wurde gefriergetrocknet ("CM_2"). Die vereinigten, trockenen Rückstände wurden der Eisessig-Äther-Fällung unterzogen (s. oben). Die trockene Fällung erhielt die Laborbezeichnung "CM_3".

Das Gewebe aus menschlichem Gehirn wurde auf gleiche Weise extrahiert.

3. Enzymatischer Abbau

Von den Extrakten und dem Substanz P-Standard wurden je 10 mg in 1 ml Tyrode gelöst. Den Testansätzen wurde je 1 mg Trypsin, in 1 ml Tyrode gelöst, zugegeben, den Kontrollansätzen reine Tyrodelösung. Um auszuschliessen, dass reine Trypsinlösung bereits eine Kontraktion des Darmes hervorruft, liessen wir einen Ansatz mit 1 mg Trypsin in 2 ml Tyrodelösung mitlaufen. Alle Ansätze wurden 1 Stunde bei 37° C incubiert, danach 10 Minuten gekocht, um das Enzym zu inaktivieren und anschliessend am isolierten Meerschweinchenileum auf ihre Aktivität getestet.

4. Biologische Teste

Bestimmung der Substanz P-Aktivität am isolierten Meerschweinchenileum: Wir verwendeten das Endstück des Meerschweinchenileums bei 37°,C in Tyrodelösung mit Zusatz von Atropin, Mepyramin und Lysergsäurediaethylamid (je 10^{-7} g/ml) (Methode s. LEMBECK und ZETLER, 1962).

Die beiden Extrakte wurden hier und an allen anderen biologischen Präparaten mit dem Substanz P-Standard und untereinander verglichen.

Bestimmung der Substanz P-Aktivität am isolierten Rattenuterus Die Tiere erhielten 16 bis 24 Stunden vor dem Versuch 0.1 mg/kg Stilboestrol subcutan injiziert. Der Uterus wurde in Dale'scher Lösung mit Atropin, Mepyramin und Lysergsäurediaethylamid (10^{-7} g/ml) bei 28° C verwendet.

Bestimmung der Substanz P-Aktivität am Kaninchenjejunum: Das Kaninchenjejunum befand sich bei 37° C in modifizierter Lockelösung mit je 10^{-7} g/ml Atropin, Mepyramin und Lysergsäurediaethylamid (LASZLO, 1963). In der Versuchsanordung nach TOH (1963) wurde Atropin weggelassen und der Badflüssigkeit das Lokalanaesthetikum Nupercain (1 µg/ml) zugesetzt.

Bestimmung der Substanz P-Aktivität am Kaninchenblutdruck: Zur Narkose erhielten die Tiere 60 mg/kg Nembutal intravenös. Zu Beginn des Versuches wurden 4 mg/kg Atropin und 1 mg/kg Mepyramin subcutan injiziert. Die zu testenden Lösungen wurden in die Vena femoralis injiziert. Der Blutdruck wurde in der Arteria carotis mit einem Manometer nach CONDON (1951) registriert.

5. Papierchromatographie

Wir benutzten das Papier 2214a von Macherey und Nagel und folgende Laufmittelsysteme: n-Propanol : Eisessig : Wasser 4 : 1 : 2 (v/v/v) und die organische Phase des Systems n-Butanol : Eisessig : Wasser 40 : 10 : 50 (v/v/v). Von den Extrakten und dem Standard wurden Mengen, die 50 bis 80 E Substanz P enthielten, als wässrige Lösung strichförmig aufgetragen.

Wir chromatographierten aufsteigend nach 3 bis 4 Stunden Aequilibrieren. Nach 14 bis 16 Stunden Laufzeit wurden die Chromatogramme getrocknet. Senkrecht zur Startlinie wurden 1 bis 2 cm breite Streifen abgeschnitten und mit Ninhydrin angefärbt.

Der übrige Teil des Chromatogramms wurde parallel zur Startlinie in 1 cm breite, vom Start bis zur Front durchnummerierte Streifen zerschnitten und diese zum Nachweis biologisch aktiver Substanzen direkt ins Wasserbad gehalten. Zum Austesten der Chromatogramme benutzten wir das isolierte Meerschweinchenileum.

6. Papierelektrophorese

Auch für die Papierelektrophorese verwendeten wir das Papier 2214a der Firma Macherey und Nagel in Streifen von 9 x 28 cm mit Laufrichtung quer zur Faserrichtung. Es wurde 0.05 m Acetatpuffer von pH 4.95 und der Ionenstärke 0.05 verwendet (ZETLER, 1961). Die Elektrophorese lief 6 Stunden bei Raumtemperatur ohne Kühlung. Die angelegte Spannung betrug 440 V, die Stromstärke 20 mA.

Aufgetragen und ausgetestet wurde wie bei der Papierchromatographie.

7. Säulenchromatographie

Wir verfuhren hier nach der Methode von ZETLER (1961). Die Säulen bestanden aus je 50 g Al_2O_3 "WOELM" sauer und hatten die Abmessungen 16 x 200 mm. Auf die Säulen wurden aufgebracht: 130 mg Standard P, 180 mg des GADDUM-Extraktes (GE_2) und 250 mg des Chloroform-Methanol-Extraktes (CM_3). Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 200 mm^3/min/g Al_2O_3. Wir eluierten zuerst mit 160 ml 70 %igem Methanol, dann mit 160 ml destilliertem Wasser und danach mit 280 ml n/10 NaOH. Mit 70 %igem Methanol eluiert man nach ZETLER (1961) die Fraktion F_a, mit destilliertem Wasser die Fraktion F_b und mit n/10 NaOH die Fraktion F_c. Das Eluat wurde in Portionen von je 20 ml gesammelt, diese Fraktionen im Rundlaufverdampfer bis zur Trockne eingedampft, anschliessend in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und am isolierten Meerschweinchenileum getestet. Der Versuch wurde einmal wiederholt.

8. Bestimmung von Begleitsubstanzen in den Extrakten

Serotonin wurde mit der Methode von UDENFRIEND, WEISSBACH und BRODIE (1958) bestimmt.

Catecholamine bestimmten wir nach der Methode von v. EULER und LISHAJKO (1961).

ATP-, ADP- und AMP-Bestimmung führten wir mit den dafür vorhandenen Testpackungen der Firma Boehringer, Mannheim, durch.

Acetylcholin wurde nach der Methode von AMMON und KWIATOWSKI (1934) am Rückenmuskel des Blutegels bestimmt.

9. Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der beiden Extrakte benutzten wir die kolorimetrische Biuretmethode nach GLEISS und HINSBERG (zit. n. HINSBERG und LANG, 1957).

10. Extraktion von Ocytocin aus Hypophysenhinterlappen des Schweines

Aus 12 Hypophysenhinterlappen von Schweinen wurde nach der Vorschrift der British Pharmacopoeia (1963) Aceton-Trockenpulver hergestellt (Laboratory Standard Preparation). Die eine Hälfte dieses Pulvers wurde in Tyrodelösung aufgenommen und am isolierten Uterus eines virginellen Meerschweinchen gegen Syntocinon getestet. Die andere Hälfte wurde mit 10 ml/g Trockenpulver Chloroform-Methanol 2 : 1 extrahiert, der Rückstand getrocknet, der Überstand bis zur Trockne eingedampft, beide in Kochsalzlösung aufgenommen und am isolierten Meerschweinchenuterus gegen Syntocinon getestet.

Weitere 6 Hinterlappen von Schweinehypophysen wurden zuerst mit 10 ml Chloroform-Methanol/g Gewebe extrahiert. Aus dem getrockneten Rückstand wurde Aceton-Trockenpulver hergestellt und dieses in Tyrode gelöst und gegen Syntocinon am Meerschweinchenuterus getestet. Der Überstand wurde bis zur Trockne eingedampft, die eine Hälfte des trocknen Materials in Tyrode gelöst, die andere Hälfte 10 Minuten mit n/10 HCl gekocht und das pH anschliessend mit n NaOH auf 5.5 gebracht. Beide Lösungen wurden am isolierten Meerschweinchenuterus gegen Syntocinon auf ihre Aktivität getestet.

11. Bestimmung von Ocytocin am isolierten Uterus des Meerschweinchens

Wir verwendeten den isolierten Uterus eines virginellen Meerschweinchens in Tyrodelösung mit Zusatz von Atropin, Mepyramin und Lysergsäurediaethylamid (je 10^{-7} g/ml).

Ergebnisse

1. Wirksamkeit der Extrakte. Abbau mit Trypsin

Beide Extrakte waren in den oben genannten biologischen Testen aktiv und beide wurden durch Trypsin inaktiviert, während die Kontrollansätze voll aktiv blieben. Unter den gegebenen Bedingungen musste die aktive Substanz - zumindest im GADDUM-Extrakt - Substanz P sein. Aus der Tatsache, dass auch der Chloroform-Methanol-Extrakt durch Trypsin inaktiviert wird, kann man schliessen, dass auch der darmkontrahierende Stoff dieses Extraktes ein Peptid ist, dass er also der Substanz P zumindest ähnlich ist. Wenn in diesem Extrakt mehrere wirksame Substanzen sind, so gilt für jede bezüglich ihrer Struktur die gleiche Überlegung, da der Extrakt mit Trypsin vollständig inaktiviert wird.

2. Ausbeute bei beiden Verfahren

Die hier angegebenen Werte wurden durch Vergleich der Extrakte mit dem Standard-Präparat am isolierten Meerschweinchenileum gewonnen.

Extrakt nach GADDUM: Der auf pH 5.5 gebrachte Überstand nach dem sauren Kochen ergab ein Trockengewicht von durchschnittlich 100 mg/g Frischgewebe und hatte eine Aktivität von 0.25 E Substanz P/mg Trockenextrakt (GE_1). Daraus ergeben sich ein Substanz P-Gehalt von 25 E Substanz P/g Frischgewebe und damit 125 000 E Substanz P in den 5 kg Ausgangsmaterial. Nach der Eisessig-Äther-Extraktion hatten wir 7.8 g eines Pulvers (GE_2) mit der Aktivität von 10.2 E Substanz P/mg, also insgesamt 79 000 E Substanz P.

Chloroform-Methanol-Extrakt: Bei der Extraktion mit Chloroform-Methanol gab 1 g Frischgewebe nach dem sauren Kochen

18 mg Trockenpulver mit einer Aktivität von 1.1 E Substanz P/mg (CM_2). Das ergibt 20 E Substanz P/g Frischgewebe und bei 5 kg Ausgangsmaterial 100 000 E Substanz P.

Nach der Eisessig-Äther-Fällung erhielten wir 10.4 g Trockenpulver (CM_3) mit der Aktivität 6.7 E/mg, das sind insgesamt 70 000 E Substanz P.

Der Unterschied in der Ausbeute liegt wahrscheinlich daran, dass bei der Chloroform-Methanol-Extraktion einer so grossen Hirnmenge und der anschliessenden Aufarbeitung die Verluste etwas grösser sind als nach dem Verfahren nach GADDUM. In den Vorversuchen, die wir mit Hirnmengen von 10 bis 50 g durchführten, waren die Ausbeuten mit beiden Verfahren gleich gross. Die Tatsache, dass man mit beiden Verfahren gleich viel Aktivität erhält, lässt sich am einfachsten erklären, wenn man annimmt, dass mit beiden Verfahren dieselben Substanzen extrahiert wurden. Für diese Annahme spricht, dass man im getrockneten Rückstand der Chloroform-Methanol-Extraktion mit dem Extraktionsverfahren nach GADDUM keine Substanz P mehr findet. Wenn in beiden Extrakten dieselben biologisch aktiven Substanzen enthalten sind, müssten die Extrakte an den verschiedenen biologischen Präparaten im gleichen Gewichtsverhältnis wirksam sein. Weiter müsste man - wenn die Annahme zutrifft - erwarten, dass mit beiden Extraktionsverfahren im Hirn dieselbe Verteilung der Substanz P-Aktivität gefunden wird.

3. Vergleich der beiden Extrakte mit dem Substanz P-Standard und untereinander am Meerschweinchenileum, Rattenuterus, Kaninchenjejunum und Kaninchenblutdruck (Tab. 1)

Die beiden Extrakte waren an allen Präparaten im gleichen Verhältnis wirksam; 1 mg Extrakt nach GADDUM war 1.4 bis 1.5 mg Chloroform-Methanol-Extrakt äquivalent. Das spricht dafür,

	1 mg GE_2 = mg CM_3	1 mg GE_2 = Einh. SP Standard	1 mg CM_2 = Einh. SP Standard
Meerschwein-chenileum	1.5 1.6 1.4 1.5 1.5 M: 1.5	10.0 11.0 10.8 9.0 10.0 M: 10.2 (= 0.77 mg SP-St.)	6.5 7.0 7.6 6.0 5.5 M: 6.7 (= 0.56 mg SP-St)
Rattenuterus	1.6 1.0 1.0 2.0 2.0 1.0 M: 1.4	4.0 1.7 2.0 3.0 4.0 1.4 M: 2.7 (= 0.20 mg SP-St.)	2.4 1.7 2.0 1.5 2.0 1.4 M: 1.8 (= 0.13 mg SP-St.)
Kaninchen-jejunum	1.5 1.7 1.5 1.4 1.6 M: 1.5	23 12 15 11 16 M: 15 (= 1.1 mg SP-St.)	15 7 10 8 10 M:10 (= 0.76 mg SP-St.)
Kaninchen-blutdruck	1.35 1.30 1.50 1.30 1.50 M: 1.4	10.0 20.0 15.0 20.0 15.0 M: 16.0 (= 1.2 mg SP-St.)	7.5 15.0 10.0 15.0 10.0 M:11.2 (= 0.84 mg SP-St.)

Tabelle 1: Vergleich der beiden Extrakte mit dem Substanz P-Standard und untereinander an den biologischen Test-Praparaten

dass beide Extrakte entweder nur eine wirksame Substanz oder mehrere wirksame Substanzen im gleichen Mischungsverhältnis enthalten. Ob die Extrakte nur eine oder mehrere wirksame Substanzen enthalten,und ob es sich in beiden Extrakten um chemisch gleiche oder chemisch verschiedene Substanzen handelt, versuchten wir mit Hilfe der Papierchromatographie, der Elektrophorese und der Säulenchromatographie zu klären.

Der Vergleich des Standard-Präparates mit dem GADDUM-Extrakt (GE_2) ergibt ein Wirkungsverhältnis von Standard zu GADDUM-Extrakt am Meerschweinchenileum von 0.77, am Kaninchenjejunum von 1.1, am Kaninchenblutdruck von 1.2 und am Rattenuterus von 0.20. Das Standard-Präparat ist also am Rattenuterus 4 bis 6mal wirksamer als der GADDUM-Extrakt. Das Wirkungsverhältnis von Standard zu Chloroform-Methanol-Extrakt (CM_3) beträgt am Meerschweinchenileum 0.51, am Kaninchenjejunum 0.76, am Kaninchenblutdruck 0.84 und am Rattenuterus 0.13. Der Standard ist gegenüber dem Chloroform-Methanol-Extrakt am Rattenuterus ebenfalls 4 bis 6mal aktiver als an den anderen Präparaten. Die aktiven Stoffe der beiden Extrakte haben dieselbe biologische Wirksamkeit, während das Standard -Präparat ein anderes Wirkungsspektrum hat. Daraus folgt, dass das biologisch aktive Material des Standards anders zusammengesetzt ist als das der beiden Extrakte.

Im Gegensatz zur Hemmung der Wirkung der Substanz B von TOH (1963) wurde die Wirkung beider Extrakte auf das Kaninchenjejunum durch Nupercain (10^{-6} g/ml) in der Badflüssigkeit nicht gehemmt.

Am Kaninchenjejunum, das wir nach LASZLO (1963) als empfindlichen Test auf Nucleotide verwendeten, zeigten die beiden Extrakte auf der Stufe nach dem sauren Kochen (GE_1 und CM_2) einen bemerkenswerten Unterschied: Der Extrakt nach GADDUM führte zu einer Erschlaffung mit anschliessender, allmählicher

Kontraktion, wie es nach LASZLO (1963) für Nucleotide typisch ist, während der Chloroform-Methanol-Extrakt schon auf dieser Reinigungsstufe sofort zu einer raschen Kontraktion führte.

Nach der Ammoniumsulfatfällung und Eisessig-Äther-Extraktion führte auch der Extrakt nach GADDUM (GE_2) ohne Erschlaffung zu einer raschen Kontraktion.

4. Die Substanz P-Konzentration in vier verschiedenen Regionen des menschlichen Gehirns bei der Extraktion mit Chloroform-Methanol und bei der Extraktion nach GADDUM

Bei der Extraktion mit Chloroform-Methanol findet man in jeder untersuchten Region gleich viel Substanz P-Aktivität pro Gramm Gewebe wie bei der Extraktion nach GADDUM. Das spricht dafür, dass der aktive Stoff im Chloroform-Methanol-Extrakt derselbe ist wie im Kochextrakt (s. Abb. 1).

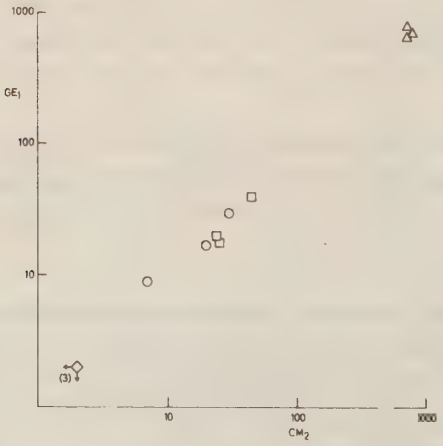

Abb. 1
Gegeneinander aufgetragen sind die Ausbeuten an Substanz P-Aktivität (Einh. SP/g Frischgewebe) homogenen Gewebsmaterials aus Substantia nigra (△), Stammhirn (□), Grosshirn (○) und Kleinhirn (◇); auf der Abszisse Ausbeuten mit Chloroform-Methanol-Extraktion, auf der Ordinate Ausbeuten mit der Extraktion nach GADDUM.

5. Papierchromatographische Untersuchungen mit den beiden Extrakten und der Standard-Substanz P

Die Aktivität verteilte sich bei allen Chromatogrammen, auf denen sie überhaupt gewandert war, über 2 bis 3 Streifen. Der Berechnung des R_f-Wertes legten wir den Streifen mit der meisten Aktivität zugrunde.

In beiden Gemischen fanden wir in den 3 Präparaten in je 5 Versuchen nur einen Aktivitätsgipfel.

Lösungsmittelsystem n-Propanol : Eisessig : Wasser
4 : 2 : 1 (v/v/v)

	R_f Mittelwert	R_f Bereich
GADDUM-Extrakt GE_2	0.73	(0.68 - 0.78)
Chloroform-Methanol-Extrakt CM_3	0.55	(0.53 - 0.60)
SP-Standard	0.42	(0.38 - 0.45)

Lösungsmittelsystem n-Butanol : Eisessig : Wasser
40 : 10 : 50 (v/v/v)

	R_f Mittelwert	R_f Bereich
GADDUM-Extrakt GE_2	0.27	(0.25 - 0.30)
Chloroform-Methanol-Extrakt CM_3	0.20	(0.19 - 0.20)
SP-Standard	0.19	(0.18 - 0.20)

Die aktiven Zonen waren in allen Chromatogrammen mit Ninhydrin anfärbbar. Die Ausbeute bei der Austestung betrug 20 bis 30 %.

6. Verhalten der Extrakte bei der Elektrophorese

Das biologisch aktive Material des GADDUM-Extraktes (GE_2) und das des Standards wanderte unter den gegebenen Bedingungen 60 mm (50 bis 70) vom Start zur Kathode, das des Chloroform-Methanol-Extraktes (CM_3) 30 mm (25 bis 35). Diese Ergebnisse waren gut reproduzierbar (n = 5).

7. Auftrennung der Extrakte und des Standards an der Aluminiumoxydsäule

80 % der Aktivität des Standards bestand aus F_b, der Rest aus F_a. Im Chloroform-Methanol-Extrakt (CM_3) fand sich nur F_a. Im Extrakt nach GADDUM (GE_2) machte F_a 74 % der Aktivität aus, der Rest war zu gleichen Teilen auf F_b und F_c verteilt. Die Ausbeute war bei allen drei Präparaten praktisch 100 %. In beiden Versuchen waren die Ergebnisse gleich.

Bilanz der 2 Versuche

	Fraktionen nach ZETLER	Substanz P-Standard		Chloroform-Methanol-Extrakt (CM_3)		GADDUM-Extrakt (GE_2)	
Eluens		E	%	E	%	E	%
70 %iges Methanol	F_a	350	18	1650	97	1380	74
dest. Wasser	F_b	1375	80	--	--	240	13
0.1 n NaOH	F_c	--	--	--	--	240	13
eingesetzt		1270		1700		1800	
Ausbeute		1680	98	1650	97	1860	103

Die chromatographischen und elektrophoretischen Untersuchungen zeigen, dass das biologisch aktive Material der beiden Extrakte chemisch verschiedene Substanzen sind. Bei der Papierchromatographie sind die Unterschiede der R_f-Werte im ersten Gemisch so gross, dass man mit Sicherheit auf chemisch verschiedene Substanzen schliessen kann. Im zweiten Gemisch sind die R_f-Werte aller Präparate kleiner und ebenso die relativen Unterschiede der R_f-Werte.

Bei der Elektrophorese wandert das Material des GADDUM-Extraktes (GE_2) doppelt so schnell wie das des Chloroform-Methanol-Extraktes (CM_3).

Das biologisch aktive Material des Chloroform-Methanol-Extraktes (CM_3) wird nicht durch Aluminiumoxyd adsorbiert, vom GADDUM-Extrakt (GE_2) nur ein kleiner Teil. Nur das aktive Material des Chloroform-Methanol-Extraktes (CM_3) liess sich mit keinem der drei Verfahren in 2 oder mehr Fraktionen auftrennen.

8. Gehalt der Extrakte an Acetylcholin, Catecholaminen, Serotonin, ATP, ADP und AMP

Die angeführten Substanzen interferieren bei den biologischen Testen und machen dadurch die Substanz P-Bestimmung ungenau. Ihre Wirkungen können wohl zum Teil durch Antagonisten aufgehoben werden, doch gibt es nicht für jede dieser Substanzen einen spezifischen Antagonisten. Deshalb haben wir den Gehalt der Extrakte an diesen Stoffen bestimmt und können, da die Schwellendosen dieser Substanzen für die einzelnen biologischen Präparate bekannt sind, daraus ersehen, ob sie die Wirkung der Substanz P beeinflusst haben können.

In der folgenden Tabelle haben wir die Konzentrationen der angeführten Stoffe in den beiden Extrakten, einmal bezogen auf 1 mg Extrakt und zum anderen bezogen auf 1 E Substanz P, angegeben.

	Chloroform-Methanol-Extrakt (CM_3)		GADDUM-Extrakt (GE_2)	
	ng/mg Extrakt	ng/E SP	ng/mg Extrakt	ng/E SP
Acetylcholin	< 100.0	< 14.0	< 100.0	< 10.0
Serotonin	7.5	1.1	9.0	0.9
Catecholamine	3.4	0.5	6.8	0.7
ATP	230.0	35.0	290.0	29.0
ADP	90.0	13.0	120.0	12.0
AMP	--	--	710.0	71.0

In diesen Konzentrationsverhältnissen wird die Substanz P-Wirkung von den Begleitsubstanzen nicht mehr beeinflusst, zumal Antagonisten gegen Acetylcholin, Serotonin und Catecholamine zugesetzt sind.

9. Proteingehalt der beiden Extrakte

Der Extrakt nach GADDUM (GE_2) enthält 53.2 % Protein, der Chloroform-Methanol-Extrakt (CM_3) 6.65 %. Der Chloroform-Methanol-Extrakt ist, auf Protein bezogen, fünfmal aktiver als der GADDUM-Extrakt.

10. Ergebnis der vergleichenden Extraktion von Hypophysenhinterlappen des Schweines

Im Aceton-Trockenpulver von 6 Hypophysenhinterlappen fanden wir eine Aktivität, die 460 E Syntocinon entspricht. Das Trockenpulver der anderen 6 Hypophysenhinterlappen wurde - wie beschrieben - mit Chloroform-Methanol extrahiert. Im Chloroform-Methanol fanden wir eine Aktivität von 30 E Syntocinon, im Rückstand eine von 480 E Syntocinon, d.h., etwa 6 % der Gesamtaktivität ging in das Chloroform-Methanol. Wurde das Gewebe von 6 Hypophysenhinterlappen zuerst mit Chloroform-Methanol extrahiert und aus dem Rückstand anschliessend das Trockenpulver hergestellt, so fanden wir im Chloroform-Methanol-Extrakt eine Aktivität, die 60 E Syntocinon entspricht, im Rückstand eine, die 450 E Syntocinon entspricht, d.h., etwa 8 % der Aktivität wurden mit Chloroform-Methanol extrahiert. Saures Kochen des Chloroform-Methanol-Extraktes änderte die Aktivität nicht. Im Gegensatz zu Substanz P kann also nur ein kleiner Bruchteil des Ocytocin mit Chloroform-Methanol extrahiert werden.

Diskussion

Nach allen bisherigen Untersuchungen (J. FRANZ, R.A. BOISSONNAS, E. STÜRMER, 1961; K. VOGLER, W. HAEFELY, A. HÜRLIMANN, R.O. STUDER, W. LERGIER, R. STRÄSSLE, K.H. BERNEIS, 1963) ist Substanz P ein Peptid von sehr hoher Wirksamkeit an glatten Muskeln und auf die Gefässpermeabilität (F. LEMBECK, R. STARKE, 1963). Im Nervengewebe ist die grösste Menge in der Fraktion der synaptischen Vesikel zu finden (CLEUGH, 1962; INOUYE und KATAOKA, 1962; RYALL, 1962). Über die Art der Bindung von Substanz P im Gewebe findet sich nur bei LEACH (1959) der Hinweis, dass nach Behandlung mit n-Butanol die Substanz P-Ausbeute höher ist; das spricht für die Abspaltung von Substanz P aus einem Lipoproteinkomplex (LEACH, 1959).

Die vorliegenden Versuche zeigen, dass Substanz P mit Chloroform-Methanol, also dem üblichen Extraktionsmittel für Lipide, quantitativ aus Gewebe extrahiert werden kann. Der in Wasser suspendierte Chloroform-Methanol-Extrakt (CM_1) zeigt jedoch noch nicht die volle Aktivität, erst nach Erhitzen dieser Suspension im Sauren (pH 2) und Abtrennen der dabei entstehenden Fällung ist die volle Darmaktivität zu finden (CM_2). Durch Gefriertrocknen, Lösen in Eisessig und Fällung mit Äther, wurde eine weitere Reinigung erzielt (CM_3). Daraus ergibt sich die Annahme, dass zunächst ein Proteolipid vorliegt und durch Kochen das wasserlösliche Protein bzw. Peptid abgespalten wird. Nach SVENNERHOLM (1964) werden durch Kochen von den Proteolipiden die Proteine bzw. Peptide abgespalten. Da der Chloroform-Methanol-Extrakt erst nach dem Kochen voll aktiv ist, wird wahrscheinlich auch hier das aktive Peptid erst aus einem grösseren Komplex abgespalten.

Zur weiteren Identifizierung der darmkontrahierenden Substanz aus der Proteolipidfraktion musste ihre Peptidnatur, ihre Wirkung an verschiedenen biologischen Testpräparaten,

ihre Menge in verschiedenen Gehirnabschnitten, sowie ihr papierchromatographisches und elektrophoretisches Verhalten mit einem üblichen Substanz P-Extrakt verglichen werden. Hierbei ergaben sich folgende Übereinstimmungen: Der Chloroform-Methanol-Extrakt (CM_3) wird ebenso wie der übliche Substanz P-Extrakt nach GADDUM (GE_2) durch Incubation mit Trypsin inaktiviert. Der qualitative pharmakologische Vergleich mittels quantitativer Testung der Aktivität an vier verschiedenen Präparationen (Meerschweinchenileum, Kaninchenjejunum, Kaninchenblutdruck, Rattenuterus) ergab völlig übereinstimmende Relationen zwischen den beiden Extrakten (CM_3, GE_2, Tab. 1). Hingegen ergaben sich deutliche gleichartige Unterschiede gegenüber dem aus Darm gewonnenen Standard-Präparat. Daraus ergibt sich, dass die aus Darm gewonnenen Substanz P-Standard-Präparate für die Bestimmung von Substanz P aus Gehirn ungeeignet sind. Es ist schon aufgrund der Untersuchungen von ZETLER (1964) mit mehr darmkontrahierenden Substanzen (ausser biogenen Aminen) in Darmextrakten als in Hirnextrakten zu rechnen.

Die Extraktion von Hirngebieten mit unterschiedlichem Substanz P-Gehalt ergab mit beiden Methoden völlig übereinstimmende Werte. Beide Methoden ergaben die gleiche Ausbeute, was auch die Regressionsgerade mit einer Neigung von 45° deutlich zeigt (Abb. 1).

Die Extraktion von Substanz P mit Chloroform-Methanol führte zu der Frage, ob auch andere biologisch aktive Peptide mit Lipidbindung im Gewebe vorkommen und mit Lipidextraktionsverfahren zu gewinnen sind. Die Extraktion von Ocytocin aus Schweinehypophysen ergab jedoch, dass höchstens 10 % der Aktivität mit Chloroform-Methanol extrahiert werden und 90 % im Rückstand bleiben.

Eine Lipidbindung ist demnach bisher nur für Substanz P nachgewiesen worden.

Unterschiede zwischen dem aktiven Material beider Extrakte fanden wir bei der Papierchromatographie und der Papierelektrophorese. In beiden Gemischen, die bei der Papierchromatographie verwendet wurden, hatte das aktive Material der beiden Extrakte verschiedene R_f-Werte. Die Bewertung dieses Befundes bedarf gewisser Einschränkungen: Die Aktivität von GE_2 und CM_2 liegt in der Grössenordnung von 10 E/mg, d.h., nur 1/10 000 der Menge bestand aus Substanz P. Es ist möglich, dass dieses kleine aktive Peptid an grösseren "Schlepper"-Molekülen haftet, diese Schlepper in beiden Extrakten verschieden sind und sich daher die Komplexe chromatographisch verschieden verhalten. Dass eine solche Anlagerung an andere Moleküle eine Rolle spielen könnte, zeigten Versuche, in denen ein Substanz P-Präparat der Firma BAYER einer Ammoniumsulfatfällung mit anschliessender Eisessig-Äther-Extraktion unterzogen wurde, was eine Änderung des R_f-Wertes der aktiven Fraktion von 0.30 auf 0.0 bis 0.1 ergab (HELD, HEIZMANN, LEMBECK, SCHLOTE unveröffentlicht).

Ähnliche Einschränkungen gelten für die Bewertung der elektrophoretischen Untersuchungen, in welchen das aktive Material beider Extrakte zwar kathodisch wanderte, aber mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Die Ergebnisse der Papierchromatographie und der Elektrophorese ergaben somit wohl deutliche Unterschiede zwischen beiden Extrakten, doch ist die Deutung schwierig.

Da bei der Papierelektrophorese und bei der Papierchromatographie alle 3 Präparate nur eine aktive Fraktion hatten, versuchten wir, an einer Aluminiumoxydsäule (ZETLER, 1961) eine weitere Auftrennung. Bei praktisch 100 % Ausbeute ergab sich, dass GE_2 zu 74 % aus ZETLERs F_a und zu je 13 % aus F_b und F_c besteht. CM_3 enthält jedoch nur F_a. Der Darmextrakt (Standard) enthielt zu 80 % F_b. Auch dies weist, ebenso wie der qualitative Vergleich an den biologischenPräparationen, auf unterschiedlichen Gehalt des Standards an verschiedenen Fraktionen im Vergleich zu den beiden Extrakten

hin. Nur CM_3 gibt auch mit diesem Trennverfahren nur eine aktive Fraktion.

An Begleitstoffen ist im GE_2 etwa achtmal mehr Protein enthalten als im CM_3. Auf Protein bezogen, ist CM_3 etwa fünfmal aktiver als GE_2. Acetylcholin, Catecholamine, 5-Hydroxytryptamin, ATP und ADP sind im GE_2 und CM_3 in etwa gleichen Mengen vorhanden. In diesen Mengen stören sie die Substanz P-Wirkung an den biologischen Präparationen nicht mehr, besonders da bei der Testung für Acetylcholin, 5-Hydroxytryptamin und Histamin Antagonisten verwendet wurden. AMP, welches die Testung von Substanz P in erheblicher Weise stört (LASZLO, 1963) war nur im GE_2 nachweisbar, nicht aber im CM_3.

Über die Art des Lipids, an welches Substanz P gebunden ist, geben die vorliegenden Untersuchungen keinen Aufschluss.

Zusammenfassung

1. Substanz P wurde mit zwei verschiedenen Verfahren aus Schweinehirn extrahiert:
   a) mit der üblichen Methode nach GADDUM, mit anschliessender Eisessig-Äther-Fällung,
   b) ein getrockneter Chloroform-Methanol-Extrakt wurde in n/10 HCl suspendiert und 10 Minuten gekocht. Der getrocknete Überstand wurde der Eisessig-Äther-Fällung unterzogen.

2. Beide Extrakte waren an vier verschiedenen biologischen Präparaten (Meerschweinchenileum, Kaninchenjejunum, Kaninchenblutdruck, Rattenuterus) gleich aktiv.

3. Nach der Chloroform-Methanol-Extraktion wurde im Rückstand keine Substanz P-Aktivität mehr gefunden. Die Extraktion von Hirnregionen mit verschiedenem Substanz P-Gehalt gab mit beiden Extraktionsverfahren jeweils gleiche Substanz P-Aktivität pro Gramm Gewebe.

4. Im Gegensatz zur vollständigen Extrahierbarkeit von Substanz P aus Hirngewebe mit Chloroform-Methanol konnten damit nur 10 % der Ocytocinaktivität von Hypophysenhinterlappen extrahiert werden.

5. Der Chloroform-Methanol-Extrakt ergab bei der Auftrennung mit Papierchromatographie (2 Laufmittelsysteme), Elektrophorese und Adsorption an Aluminiumoxyd nur eine einzige aktive Fraktion. Bei der letztgenannten Methode entsprach sie ZETLERs F_a. Der GADDUM-Extrakt lieferte bei der Auftrennung an der Säule F_b und F_c, das Substanz P-Standard-Präparat aus Darm F_a, F_b und F_c.

6. Der Chloroform-Methanol-Extrakt wurde ebenso wie Substanz P mit Trypsin inaktiviert.

7. Aus den Versuchen wird der Schluss gezogen, dass Substanz P im Gewebe an ein Lipid gebunden ist, von dem es durch Hydrolyse mit n/10 HCl abgespalten werden kann.

Literaturverzeichnis

AMIN, A.H., T.B.B. CRAWFORD, J.H. GADDUM, The distribution of substance P and 5 Hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. J. Physiol. 126, 596 (1954)

AMMON, R., H. KWIATOWSKI, Die Bildung von Acetylcholin in Serum und Embryonalextrakt. Pflügers Arch. 234, 264 (1934)

British Pharmacopoiea, Preparation of Dry Pituitary (Posterior Lobe) Powder (Laboratory Standard Preparation) 1132 (1963)

CLEUGH, zit. n. V.P. WHITTAKER, Pharmacological studies with isolated cell compounds. Biochem. Pharmacol. 9, 61 (1962)

CONDON, N.E., A modification of the conventional mercury manometer for blood pressure recordings. Brit. J. Pharmacol. 6, 19 (1951)

FOLCH, J., M. LEES, Proteolipides, new type of tissue lipoproteins, their isolation from brain. J. Biol. Chem. 191, 807 (1951)

FOLCH, J., M. LEES, S. STANLEY, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497 (1957)

FRANZ, J., R.A. BOISSONNAS, E. STÜRMER, Isolierung von Substanz P aus Pferdedarm und ihre biologische und chemische Abgrenzung gegenüber Bradykinin. Helv. Chim. Acta 44, 881 (1961)

GADDUM, J.H., An antistrychnine extract from horse intestine. J. Physiol. 172, 207 (1964)

HINSBERG, K., K. LANG, Medizinische Chemie für den klinischen und theoretischen Gebrauch, Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien, 1957

INOUYE, A., K. KATAOKA, J. SHINAGAWA, 5-Hydroxytryptamine in the Sub-cellular Particles of Rabbit Brain. Nature (Lond.) 194, 285 (1962)

LASZLO, J. Removal of interfering nucleotides from brain extracts containing substance P, Effect of drugs on brain concentrations of substance P. Brit. J. Pharmacol. 21, 113 (1963)

LEACH, E., Extraction of substance P from nervous tissue. J. Physiol. 149; 34P (1959)

LEMBECK, F., Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter Impulse. Arch. exp. Path. Pharmacol. 219, 197 (1953)

LEMBECK, F., G. ZETLER, Substance P; a polypeptide of possible significance, especially within the nervous system. Rev. Neurobiol. 4, 159 (1962)

LEMBECK, F., K. STARKE, Substance P content and effect of capillary permeability of extract of various parts of human brain. Nature (Lond.) 199, 1295 (1963)

PERNOW, B., Studies on Substance P, Acta physiol.scand. 29, Suppl. 105 (1953)

RYALL, R.W., Sub-cellular distribution of pharmacologically active substances in guinea pig brain. Nature (Lond.) 196, 680 (1962)

SVENNERHOLM, L., The distribution of lipids in the human nervous system. J. Neurochem. 11, 837 (1964)

TOH, C.C., Biologically substances in brain extracts. J. Physiol. 165, 47 (1963)

UDENFRIEND, S., H. WEISSBACH, B.B. BRODIE, Assay of Serotonin and related metabolites, enzyms and drugs. Methods of biochemical analysis, edit. D. Glick, Vol. VI, p. 95, N.Y. London Interscience Publ., 1958.

VOGLER, K., W. HAEFELY, A. HÜRLIMANN, R.O. STUDER, W. LERGIER, R. STRÄSSLE, K.H. BERNEIS, A new purification procedure and biological properties of substance P. Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 378 (1963)

von EULER, U.S., J. H. GADDUM, An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. J. Physiol. 72, 74 (1931)

von EULER, U.S., E. LISHAJKO, Improved technique for the fluorimetric estimation of catecholamines. Acta physiol. scand. 51, 348 (1961)

ZETLER, G., Zwei neue pharmakologisch aktive Polypeptide in einem Substanz P-haltigen Hirnextrakt. Arch. exp. Path. Pharmacol. 242, 330 (1961)

ZETLER, G., Über das Vorkommen pharmakologisch aktiver Substanzen mit Polypeptid-Charakter in Extrakten aus Darm und Gehirn, Arch. exp. Path. Pharmacol. 246, 504 (1964)

Lebenslauf

Ich wurde am 25.1.1934 in Hirrlingen, Kreis Tübingen, geboren.

1955 machte ich am Kepler-Gymnasium in Tübingen das Abitur.

Nach dem Studium der Medizin in Tübingen und Frankfurt (Main) legte ich im Dezember 1960 in Tübingen das Staatsexamen ab.

Als Medizinalassistent war ich an den Chirurgischen Abteilungen der Krankenhäuser Reutlingen und Herrenberg und an der Frauenklinik, der Medizinischen Klinik und der Nervenklinik der Universität Tübingen.

Anfang 1963 erhielt ich die Bestallung als Arzt. Seither bin ich als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen.